

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Bakalářská práce

Teplotně korelovaná fenotypická plasticita u protist

Tereza Poláková

Supervisor: doc. RNDr. Jiří Neustupa, Ph.D.

Praha, 2010

Pod kování

Na tomto místě bych ráda podkovala svému –koliteli, Jiřímu Neustupovi, za vedení mé práce a zasloužilou podporu vdeckéinnosti. Dále bych chtělapodkovatvšem členům algologické skupiny za vytváření příjemného a podnětného pracovního prostředí.

Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala teplotně korelovanou fenotypickou plasticitou. Teoretickou část jsem rozdělila do pěti základních tematických celků. První se zabývá teplotním optimem a růstovými parametry, druhý velikostí buněk a jejím vlivem na fyziologii a ekologii protist, třetí vlivem genotypu na velikost a růstovou rychlost, čtvrtý primární produkci v souvislosti s protichůdnými jevy zvyšování růstové rychlosti a zmenšování buněk s rostoucí teplotou a pátý konkrétními příklady morfologických změn, s kterými se můžeme u protist setkat.

V praktické části jsem provedla základní analýzu vlastních dat *Micrasterias thomasi* a *Micrasterias rotata*. Porovnávala jsem buňky z květnových a říjnových období z krušnohorského prameniště. Analýza ukázala, že ani u jednoho druhu pravděpodobně neexistuje sezónně korelovaná morfologická variabilita. Data o *M. rotata* však mohou být negativně ovlivněna skutečností, že jsem ji našla pouze na jednom období v místě.

Klíčová slova: fenotyp, *Micrasteris*, plasticita, protista, teplota

Abstract

In my Bc Thesis I focused on temperature-corellated phenotypic plasticity. The theoretical part is divided into four main thematical units. The first one deals with temperature optimum and growth parameters. The second one with cell size and its infuence on the physiology and ecology of protists. The thirt one with genotyp influence on cell size and growth rate. The fourt one is about primary production and its relation to antagonistic phenomenon of increasing growth rate and decreasing cell size with increasing temperature. Finally, the fifth one is about specific examples of morphological changes which we can find in protist group.

In the practical part of the thesis I performed basic analysis of my own data about *Micrasterias thomasiana* and *Micrasterias rotata*. I compared the cells from May and October samples from the peat-bog in Kru-né hory. The result of my analysis is that there is probably no sezonally-corellted morphological variability in neither of the studied species. Data on *M. rotata* may be, however, affected by the fact that I found it at one location only.

Key words: phenotype, *Micrasterias*, plasticity, protists, temperature

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretická část	7
2. 1. Rostové parametry	7
2. 1. 1. Teplotní optimum a rychlost metabolismu	7
2. 1. 2. Rostová rychlost	8
2. 2. Velikost.....	10
2. 2. 1. Vyjádření velikosti.....	10
2. 2. 3. <i>Temperature-size rule</i>	11
2. 2. 4. Vliv velikosti na ekologii a fyziologii	13
2. 2. 5. Vliv zeměpisná šířky, stínění ročních období a globálního oteplování.....	14
2. 3. Vliv genotypu na velikost buněk a rostovou rychlost	16
2. 4. Primární produkce	17
2. 5. Morfologické změny	19
2. 5. 1. Příklady morfologických změn	19
3. Praktická část	22
3.1. Lokalita.....	22
3. 2. Metodika.....	23
3. 2. 1. Odběr a zpracování vzorků	23
3. 2. 2. Analýza dat.....	24
3. 3. Výsledky.....	25
3. 4. Diskuze	28
3. 4. 1. <i>Micrasterias thomasi</i>	28
3. 4. 2. <i>Micrasterias rotata</i>	28
4. Závěr	29
5. Literatura:	30

1. Úvod

Pod pojmem fenotypická plasticita se skrývá schopnost organismů produkovat v odlišných podmínkách prostředí různé fenotypy. Jde tedy o velmi důležitou adaptaci, protože umožňuje organismům využívat odlišnou životní strategii v různých podmínkách a tím i přežít. Jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů, který vyvolává plastickou odpověď organismů, je i teplota. Lepší znalosti o teplotně korelovaných fenotypických změnách nám umožní lépe porozumět biogeografii a ekologii protistů.

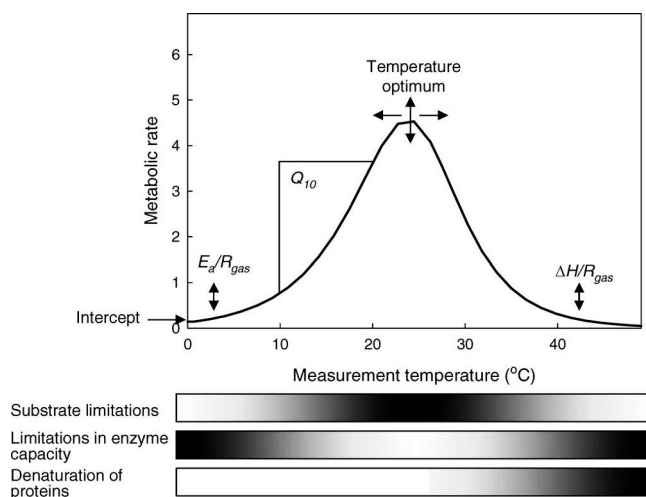
První část mé bakalářské práce je literární rešerše, která se zabývá fenotypickou reakcí protistních organismů na teplotu. Zaměřila jsem se zejména na změny růstových parametrů, velikosti a morfologie, protože tato témata přímo navazují na část druhou, praktickou, která se zabývá analýzou vlastních sběrů rodu *Micrasterias*. Mým cílem bylo zjistit, jestli mají teplotní změny vyvolané studením ročních období vliv na morfologii buněk. Tato práce byla také úvodní studií k mé budoucí diplomové práci na stejné téma a měla sloužit (a posloužila) pro seznámení se nejen se základními principy geometrické morfometrie, ale i cílé v deské práci

2. Teoretická část

2. 1. Rstové parametry

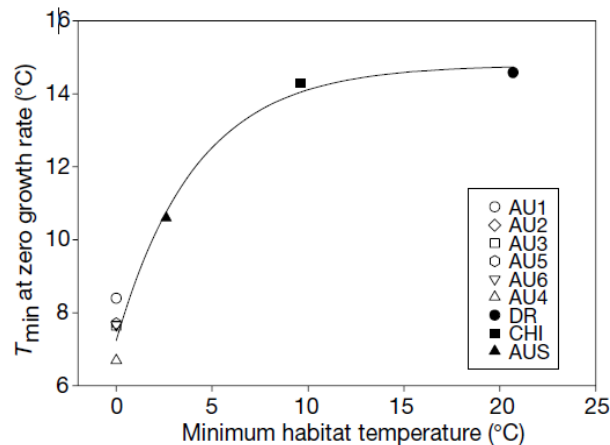
2. 1. 1. Teplotní optimum a rychlost metabolismu

V rozmezí teplot, které jsou pro organismus přirozené, vzrůstá rychlost metabolismu, což s sebou přináší zvýšené nároky na množství živin. Nejvyšší rychlosti metabolismu organismus dosáhne při teplotách, kdy jeho enzymy pracují nejúčinněji a kdy vysoká rychlost fotosyntézy není limitována nedostatkem živin, a rychlost produkce ATP a uhlohydrátů je tak nejvyšší. Tento interval teplot označujeme jako teplotní optimum (Obr. 1) (Staeher et al., 2006).



Obr. 1: Vztah teploty a metabolické rychlosti (Staeher et al., 2006): černobílé proušky pod grafem ukazují důležitost procesů regulujících metabolickou rychlost. Čím je barva tmavší, tím více je v dané teplotě proces limitující.

Protista se umí velmi dobře adaptovat na podmínky prostředí a při jejich změně dokáží během několika generací změnit rozmezí optimálních teplot (Staeher et al., 2006). Teplotní optimum ovlivňuje i geografická poloha a klimatická charakteristika oblasti, ve které organismus dlouhodobě přežívá. Studie na kosmopolitním (ale vzácném) nálevníkově *Meseres corlissi* je toho důkazem. Korelace minimální tolerované teploty a průměrné minimální teploty habitatu (Obr. 2) ukázala, že populace, které byly izolovány v chladnějších oblastech, tolerovaly nižší teploty než populace z lokalit teplejších (Gächter et al., 2006).

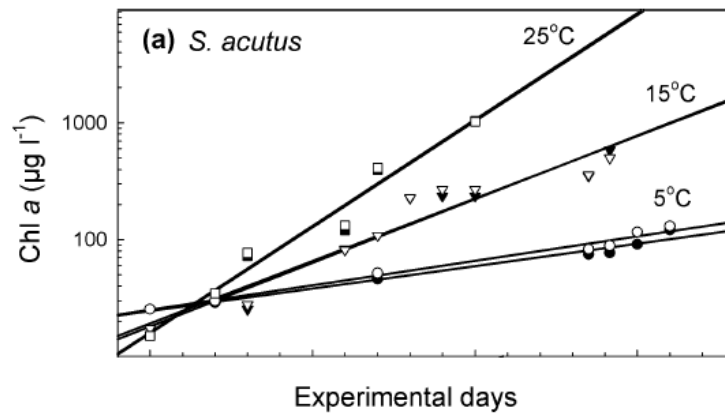


Obr. 2: Vztah tolerované teploty a teploty habitatu (Gächter et al, 2006): Lokality se azeny od nejchladnější: AU=Rakousko (1-6 značí různé míst), AUS=Austrálie, CHI= Čína, DR=Dominikánská republika.

2. 1. 2. Růstová rychlost

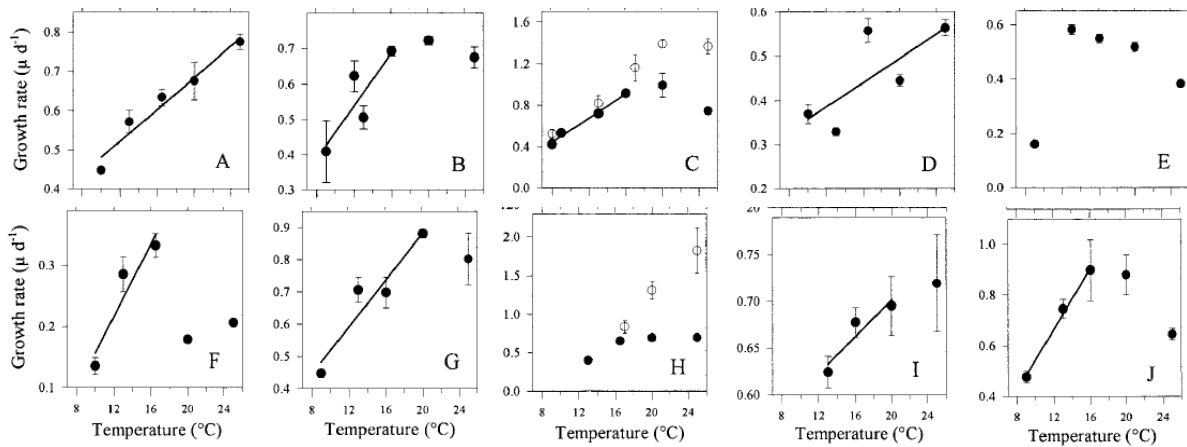
S metabolickou rychlostí úzce souvisí i růstová rychlost. Růstová rychlost je důležitým parametrem ovlivňujícím konkurenceschopnost populací. Rychlejší růstová rychlost vede k rychlejší reprodukci. Pokud se populace namnoží dříve, vzroste její fitness a může tak zaujmout větší podíl v celkové populaci. Adaptace různých druhů na odlišné teploty může být jednou z příčin sezónního kolísání početnosti jednotlivých populací (Atkinson et al., 2003). Růstová rychlost se v okolí optimálních teplot s rostoucí teplotou prostě a rychle až do dosažení teplotního optima. Raven et al. (1988) zjistili, že růstová rychlost se zdvojnásobí s přírůstkem teploty o 10°C (tzv. Q₁₀ pravidlo), její nárůst je tedy exponenciální. Někteří autoři tvrdí, že nárůst růstové rychlosti s teplotou je lineární. V literatuře se ovšem často setkáváme s doklady exponenciálního nárůstu, příklady lineárního nárůstu se objevují výjimečně. Je tedy pravděpodobné, že vliv teploty na růstovou rychlost je u jednotlivých skupin organismů odlišný (Montagnes et al., 2001).

Druhu, který vykazuje exponenciální nárůst je například *Scenedesmus acutus*. Jednotlivé populace byly kultivovány při teplotách 5, 15 a 25°C (Obr 3). Q₁₀ hodnota pak byla vypočtena jako 1,9 (Staehr et al., 2006).



Obr 3: Vliv teploty na rychlost u *Scenedesmus acutus* (Staehr et al., 2006, upraveno): Měno podle koncentrace chlorofylu a.

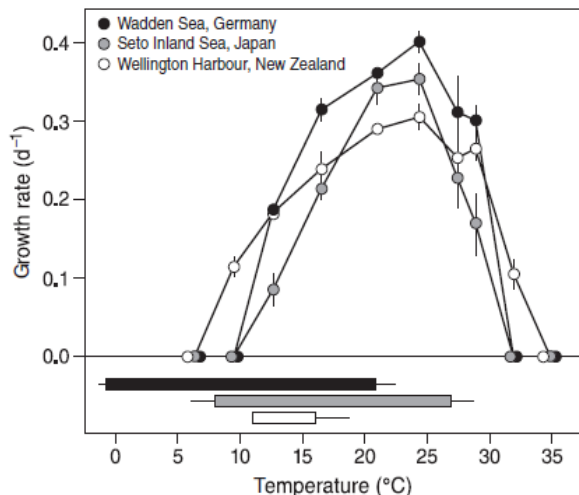
Montagnes et al. (2001) provedli studii na mnoha druzích rozsivek, která porovnávala rychlosti z vlastních měření i literárních údajů. Jejich výsledky naopak ukázaly, že rychlost růstu je u této skupiny lineární (Obr. 4).



Obr. 4: Vliv vzrůstající teploty na rychlost rozsivek (Montagnes et al., 2001)

Rychlost se pomalu zvyšuje až do dosažení rychlostního optima. Při teplotách vyšších následuje její prudký pokles (Lichtman et al., 2010). Rychlostní optima jsou tedy ve většině případů posunuta směrem k teplotám, ve kterých se organismus běžně nevyskytuje. Tento fenomén ukazuje například druh *Fibrocapsa japonica* a jeho kultury ze tří různých míst světa (Newmecko, Japonsko, Nový Zéland) (Obr. 5). Graf ukazuje rychlost a roční rozptyl

teplot habitatu, ze které byly vzorky izolovány (prouflky pod osou x). Ve všech případech je optimální rychlost výrazně vychýlená k horní limitní teplotě (De Boer et al., 2005).

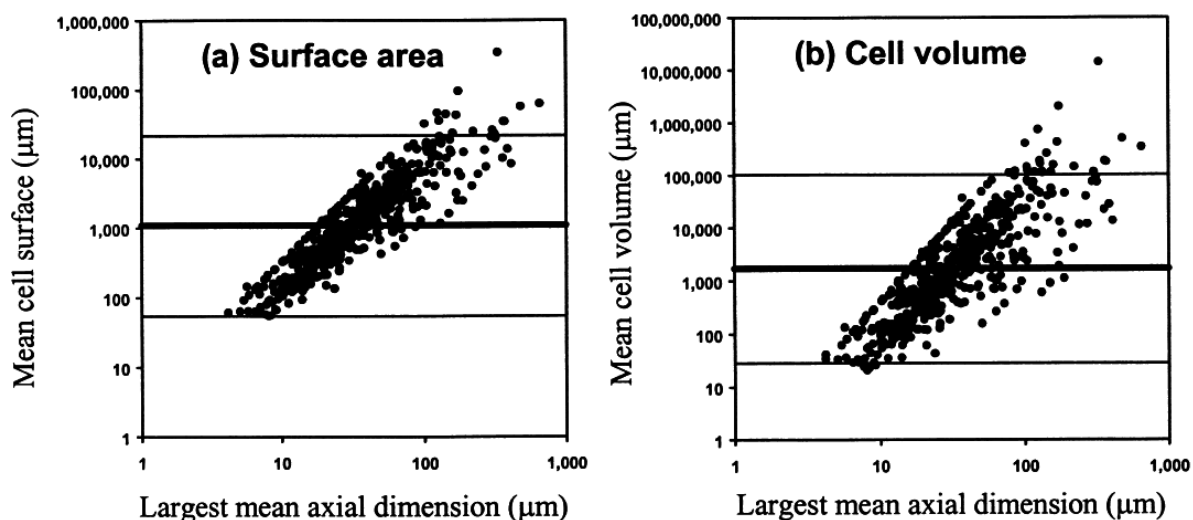


Obr. 5: Teplota habitatu a rychlost u *Fibrocapsa japonica* (De Boer et al., 2005)

2. 2. Velikost

2. 2. 1. Vyjádření velikosti

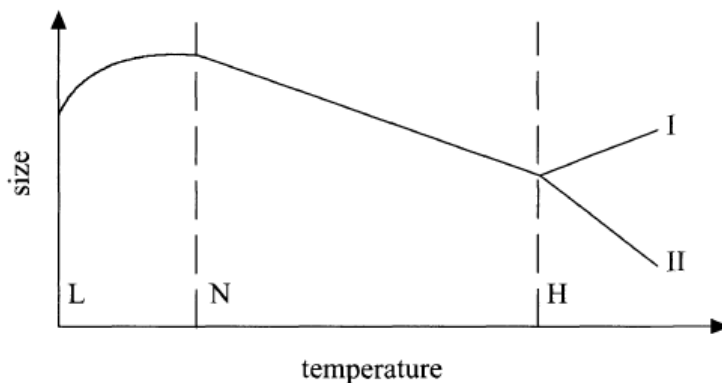
V literatuře se můžeme setkat s různými pojetími velikosti. Můžeme ji chápat jako maximální rozměr buňky, jako objem buňky nebo jako poměr povrchu vůči objemu. Rozdíly mezi jednotlivými parametry mohou přesahovat i několik řádů (Snoeijs et al., 2002), což může mít v ekologických studiích zásadní význam. Pro ekologické studie je ovšem nejvíce vypovídající objem buněk (De Miranda et al., 2004). Studie na rozsivkách (Snoeijs et al., 2002) ukázala vztah mezi maximálním rozměrem buňky, povrchem a objemem (Obr. 6). Tyto grafy ukazují pozitivní korelaci mezi jednotlivými parametry. Proto budu v dalším textu hovořit o velikosti hovořit jako o obecné vlastnosti, která ve většině případů vypovídá o všech těchto zmíněných parametrech.



Obr. 6: Vztah největšího rozměru buňky, povrchu a objemu (Snoeijs et al., 2002)

2. 2. 3. Temperature-size rule

S rostoucí teplotou roste rychlost, proto bychom očekávali, že se bude velikost jedinců zvětšovat. Je ovšem zajímavé, že tomu tak není (Atkinson et al., 1997). Pro ekotermní organizmy (jednobuněčné i mnohobuněčné) obvykle platí v zóně optimálního růstu (Obr. 7, zóna N) inverzní vztah mezi velikostí těla a teplotou (*temperature-size rule*). Chladnější podmínky (Obr. 7, zóna L) obvykle vyvolají zmenšení velikosti jedince, zatímco vysoké teploty (Obr. 7, zóna H) mohou způsobit zvětšení i zmenšení velikosti, protože odpověď je druhově specifická (Atkinson et al., 2003). Při vysokých teplotách vznikají s větší pravděpodobností teratogenní formy (Neustupa et al., 2008). S pravidlem podobným *temperature-size rule* se setkáme i u endotermních živočichů v podobě Bergmanova pravidla. Souhrnná analýza dat ukázala, že při poklesu teploty o 1 °C protista redukují svoji velikost o 2,5% oproti velikosti při 15 °C (Atkinson et al., 2003). Fenomén zmenšování ukázala i studie na rozsivce *Cylindroheca closterium* z hypersalinního prostředí. Autoři se zabývali sezónní změnou velikosti od ledna do dubna v závislosti nejen na rostoucí teplotě, ale i na vzrůstající salinitě a klesající koncentraci dusitanů. Zjistili, že velikost rozsivky se s rostoucí teplotou zmenšovala i v těchto extrémních přírodních podmínkách (De Miranda et al., 2005).



Obr. 7: Vliv teploty na velikost bun k (Atkinson et al., 2003)

V literatuře se objevují tři hlavní teorie, které *temperature-size rule* vysvětlují. Žádné z nich ovšem není univerzální - některé z nich lze aplikovat pouze do vodního prostředí, jiné zase nemohou platit pro mnohobuněčné organizmy. Na fenoménu zmenšování se pravděpodobně podílí všechny tři společně.

a) Dostupnost zdroj

Tato teorie říká, že s rostoucí teplotou klesá dostupnost zdroj (např. obsah rozpustného CO_2 , O_2 nebo fosfát a dusičnanů). Na druhou stranu ovšem vzrůstá rychlost metabolismu a s tím i nároky na jejich dostupnost. Bučky tak díky zmenšení své velikosti zvýší poměr povrchu vůči objemu, čímž umožní relativně vyšší difuzi zdrojů do bučky (Atkinson et al., 2003).

b) Rychlost dělení

Se vzrůstající teplotou roste rychlost a tím i tlak na rychlejší dělení buněk. Pokud se bučky z jedné populace namnoží rychleji než ostatní, umožní jim to zvýšit svůj celkový podíl ve společenstvu. Tento tlak na rychlejší dokončení životního cyklu vyvolá zvýšenou investici energie do reprodukce na úkor buněčného růstu. Proto se bučky dříve přeměnou a zmenší velikost. (Atkinson et al., 2003).

c) Rychlost propadu vodním sloupcem

S rostoucí teplotou klesá viskozita vody, čímž dochází k rychlejšímu propadu organismů z eufotické vrstvy směrem ke dnu. Zmenšením své velikosti mohou organismy snížit rychlost

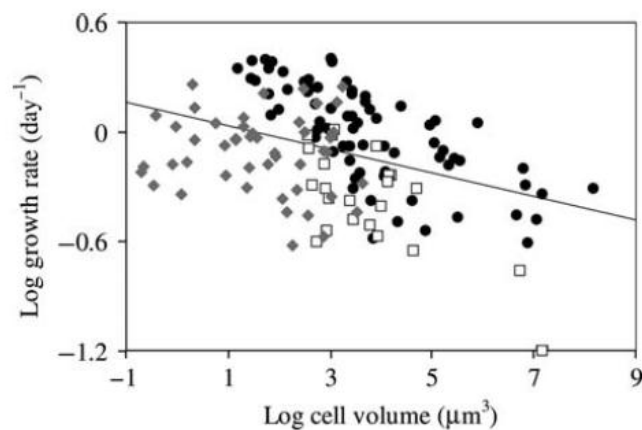
propadu (Montagnes et al., 2001). Například při poklesu teploty mořské vody z 21,5°C na 18°C vzroste dynamická viskozita vody o 4,4%, takže i organismy se propadají o 4,4% vyšší rychlostí než při 18°C. Tento nárost je stejně vysoký jako když buňka zvětší svůj poloměr o 2,2% (Finkel et al., 2010).

2. 2. 4. Vliv velikosti na ekologii a fyziologii

Mnoho studií z poslední doby dokumentuje vliv velikosti na fyziologické procesy a ekologii druhů (Morabito et al., 2007). Protože teplota ovlivňuje velikost buněk, nepřímo reguluje také tyto procesy. Dosavadní poznatky o vlivu velikosti shrnul například Finkel et al. (2010), z jejich článku sepišám v následující kapitole.

a) S rostoucí velikostí buněk klesá rychlost metabolismu na jednotku objemu. Toto pravidlo je označováno jako metabolická teorie a zdá se, že platí téměř pro všechny organismy na planetě (Brauer et al., 2009).

b) S rychlostí metabolismu a velikostí protist jsou spojeny i další důležité životní charakteristiky, jako například rostová rychlost. Obecně platí, že s rostoucí velikostí buňky klesá rostová rychlost (Obr. 8).



Obr. 8: Vztah objemu buňky a rostové rychlosti (Finkel et al., 2010): černé body značí řasivky, bílé čtverce obrnky a šedé kosočtverce ostatní organismy.

c) Větší buňky jsou znevýhodněny díky svému nízkému poměru povrchu k objemu při příjmu živin z okolí prostřednictvím difuze. Tento poměr však mohou ovlivnit protažením svého tvaru a vytvořením zářezů a výběžků (Lichtman et al., 2010).

d) Velikost buněk ovlivňuje také množství chlorofylu a jeho schopnost absorbovat sluneční záření. S klesající velikostí se zvyšuje obsah chlorofylu na jednotku objemu, protože s rostoucí teplotou klesá jeho absorpční koeficient. Teplotou vyvolané změny absorpce se projevují i změnou uspořádání pigmentů v buňce (Staeher et al., 2006).

e) Velikost také ovlivňuje spotřebu jednotlivých prvků v buňce a má tak nejen jejich poměrné zastoupení, ale i množství, které s vzrůstající velikostí klesá na jednotku objemu (Montagnes et al., 2001). To pravděpodobně kvůli nepoměrnému zvětšování vakuoly.

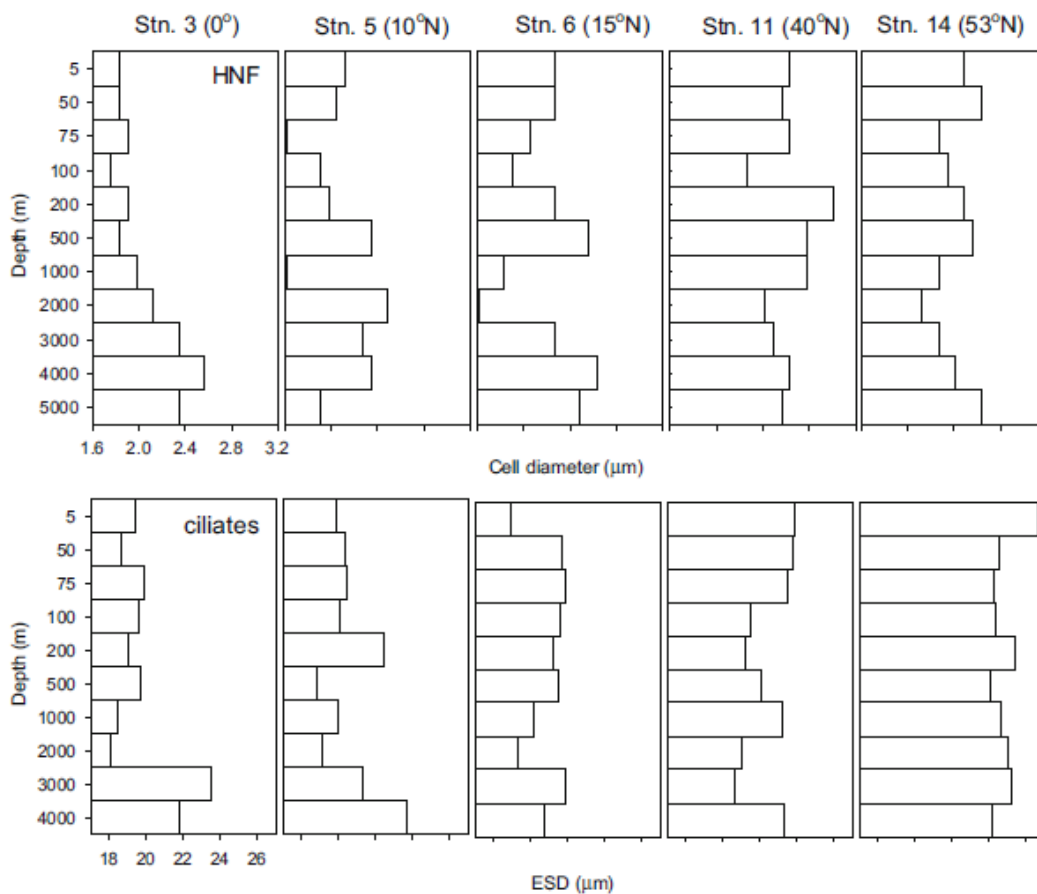
f) S rostoucí velikostí buňky roste rychlost propadu vodním sloupcem. Snížení propadovou rychlost je možné prostřednictvím zvětšení plochy nebo vytvořením výběžků a nepravidelností na povrchu (Padisák et al., 2003).

g) Velikost buněk ovlivňuje i populační dynamiku. Má vliv na potravní řetězec - velikost organismu určuje jeho přirozené predátory a přirozenou konkist. Ovlivňuje také abundanci. Čím jsou buňky menší, tím vyšší je jejich abundance (Li et al., 2006).

2. 2. 5. Vliv zeměpisné šířky, stínění ročních období a globálního oteplování

Teplotní gradient v přírodě vzniká ve větším měřítku i se změnou zeměpisné šířky, nadmořské výšky nebo v důsledku stínění ročních období. I tyto změny mají vliv na prostorovou a časovou variabilitu ve velikosti jednotlivých druhů.

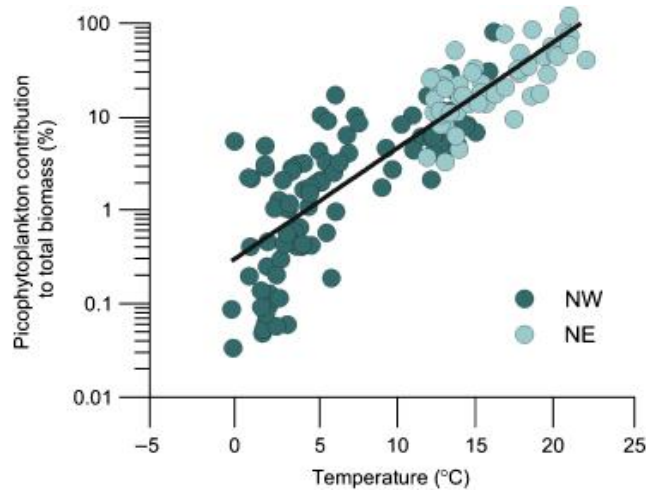
Ve studii zabývající se nálevníkem *Meseres corlissi* z tropických, subtropických a temperátních oblastí populace vykazovaly rozdíl nejen v objemu buněk, ale i v rychlosti. Objem buněk se při teplotě 15°C zmenšoval od tropických oblastí po temperátní, což ukazuje existující schopnost adaptace na přírodní podmínky lokality (Gächter et al, 2006). Zvětšování velikosti buněk vlivem teploty od tropického pásma k pólu ukázala i studie zabývající se hlubokomořskými nálevníky a nebiřkatými heterotrofy (Obr. 10) (Sohrin et al, 2010)



Obr. 10: Vztah velikosti a zeměpisné šířky u heterotrofních bezbítkých protist (HNF) a nálevníků (Sohrin et al., 2010): Popisy nad grafem (osa x) značí zeměpisnou šířku odbírané stanice, osa y pak hloubku moře. Velikost buněk byla měřena podle průměru ekvivalentní koule ϕ ESD.

Se změnami teploty ve velkém měřítku se setkáváme také v případě globálního oteplování klimatu. Jiná struktura společenstev způsobená teplejšími podmínkami může vést k významným změnám v mořském ekosystému (Morán et al, 2010). Tito autoři se zabývali složením mořského planktonu v souvislosti s globálním oteplováním. Odvodili, že v teplejším klimatu bude velikost buněk planktonu menší, ovšem jejich abundance poroste. Proto se průměrná velikost společenstva posune směrem k menším velikostem a zvýší se tak celkový podíl pikoplanktonu v planktonním společenstvu (Obr. 11). Obrázek ukazuje nárůst podílu pikoplanktonu na dvou různých lokalitách (NW, NE). Odvodili také, že pikoplankton se stane nejdůležitějším primárním producentem v oceánech při teplotách nad 20 °C. Kromě vlivu

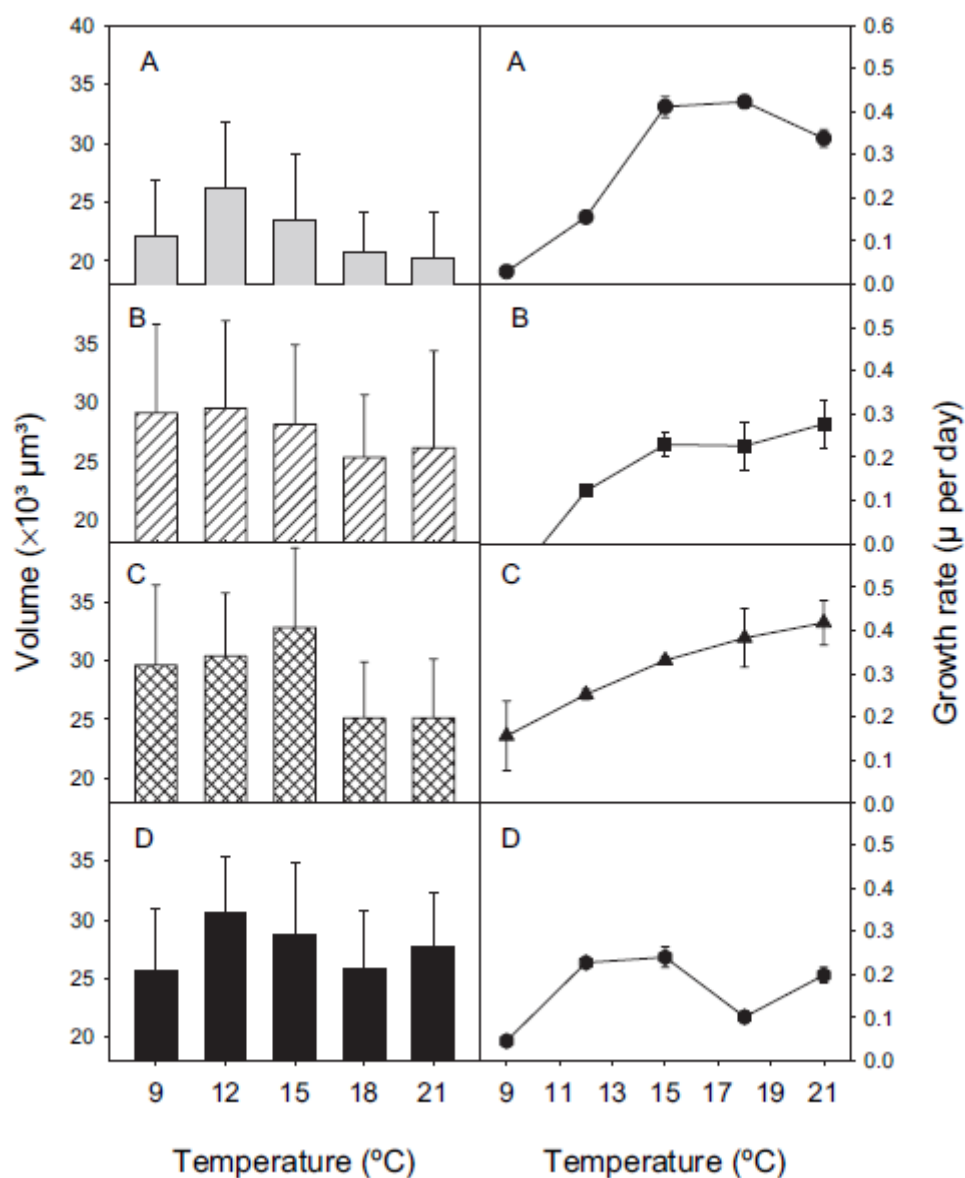
temperature-size rule se na zvýšení podílu pikoplanktonu bude podílet i zvýšená selekce ve prospěch menších organismů v důsledku abiotických změn vyvolaných teplotou, jako například zvýšená stratifikace oceánů. Zvýšené množství pikoplanktonu může například snížit množství organického uhlíku, které se ukládá prostřednictvím mrtvých těl nebo exkrementů na dně oceánů.



Obr. 11: Vliv teploty na zastoupení pikoplanktonu ve společenstvu planktonu (Morán et al., 2010)

2. 3. Vliv genotypu na velikost buněk a rychlost

Weisse et al. (2006) se zabývali studií klonů nálevníků *Coleps spatei* a *Rimostrombidium lacustris*. Nálevníky odebrali ze stejného jezera a vypěstovali jejich klonální kultury. U těchto kultur pak měřili velikost a rychlost (Obr. 12). Dospěli k zajímavému zjištění, že tyto charakteristiky se u různých kultur lišily i ve standardizovaných laboratorních podmínkách. Ve všech případech se objem buněk s rostoucí teplotou zmenšoval a rychlost narůstala, ovšem u každého klonu specificky. Například maximální rychlosti bylo u jednotlivých kultur *C. spatei* dosaženo v rozmezí 6°C. Zdá se tedy, že celková odpověď druhů, u kterých se nevyskytuje pohlavní rozmnožování nebo výrazně převládá rozmnožování pohlavní, je dána mozaikou odlišných reakcí klonů, které v těchto populacích vznikají.

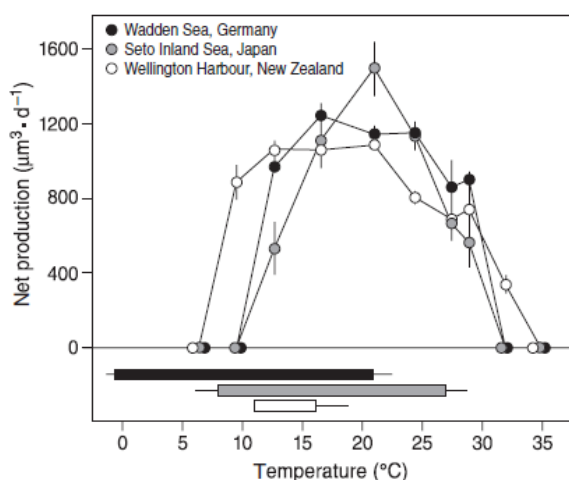


Obr. 12: Objem bun k a r stová rychlost ty klon (A, B, C, D) nálevníka *Coleps spatei* (Weisse et al., 2006)

2. 4. Primární produkce

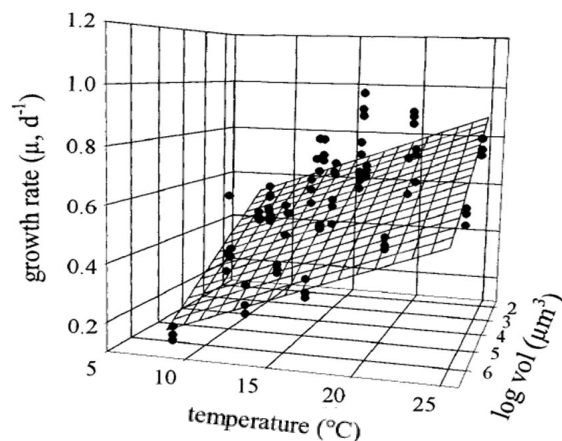
Charakteristikou kombinující vliv teploty na velikost bun k a r stovou rychlost je primární produkce, definovaná jako množství biomasy vytvořené za určitý časový úsek. Teplota zvyšuje r stovou rychlost, ale snižuje objem bun k, proto je zajímavé porovnat vliv těchto dvou protichůdných jevů.

Teplota, při které organismus dosahuje nejvyšší rychlosti, nemusí odpovídat teplotě, při které nejlépe prosperuje v přírodě. Tuto teplotu označujeme jako fyziologické optimum a obvykle se nachází několik stupňů pod rychlostním optimem. To ukazuje i Obr. 12. Při srovnání s Obr. 5, který pochází ze stejné studie na druhu *Fibrocapsa japonica*, je vidět, že maximum primární produkce je o několik °C nižší než maximální rychlost. Teploty, při kterých je dosaženo maximální primární produkce tedy dobře odpovídají fyziologickému optimu (De Boer et al., 2005).



Obr. 12: Primární produkce u *Fibrocapsa japonica* (De Boer et al., 2005)

Následující model ukazuje vzájemný vztah teploty, rychlosti a objemu buněk u rozsivek (Obr. 13). Závislost teploty a rychlosti se ukázala být lineární. Body ve 3-D modelu ukazují rychlosti a množství znázorňuje planární regresní model jejich vztahu k objemu a teplotě (Montagnes et al., 2001).



Obr. 13: Vztah teploty, růstové rychlosti a objemu buněk (Montagnes et al., 2001, upraveno)

2. 5. Morfologické změny

V této kapitole bych se ráda zmínila o vlivu teploty na disparitu protist. Studie tohoto typu byly dříve na jiných eukaryotických organizmech, například na kůdli rodu *Drosophila*, kde rostoucí vývojové teploty zvyšovaly míru disparity. Zrychlená ontogeneze způsobená vyššími vývojovými teplotami vyvolala vyšší chybovost tohoto procesu a nestejně vypadající kůdla pak způsobila vyšší disparitu (Debat et al., 2003). Bohužel však neexistují články, které by objasňovaly vliv teploty na disparitu u protist.

2. 5. 1. Příklady morfologických změn

Teplota může morfologii buněk ovlivnit mnoha způsoby. Neexistuje žádné obecné pravidlo, které by určovalo, jakým směrem se změny ubírají. Proto bych nyní některé příklady ráda ukázala na konkrétních druzích.

Fibrocapsa japonica při teplotách 18°C vytvářela oválné buňky se dvěma bílými. Při teplotě 8°C byly buňky kulaté a bílky zkrácené. Vysoké teploty způsobily shlukování buněk, v nichž některé případech se kolonie obalily slizem. Během rychlého zahřívání kultury na teploty okolo 30°C bílky odpadly a tvar buňky se zakulatil (De Boer et al., 2005).

Raphidonema nivale a *R. sempervirens* jsou druhy, které obývají polární oblasti. Přírodní vzorky byly kultivovány v různých teplotních a světelných podmínkách. Buňky *R. nivale* se s rostoucí teplotou prodlužovaly a ztvrdlo se jejich pojetí ve vláknu. U *R. sempervirens* odcházelo s rostoucí teplotou také ke ztvrdnutí a rozívnění buněk, ovšem nebyla

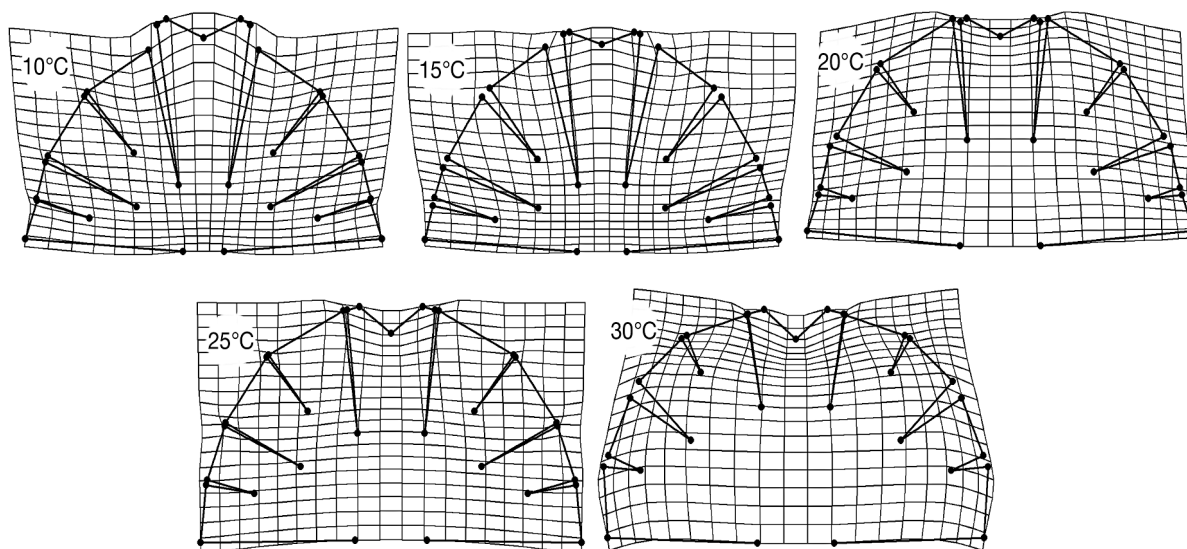
prokázána změna délky vlákna. Toto poznání přispělo k problému determinace druhů z komplexu *Raphidonema-Koliella*. (Stibal et al., 2005).

V souvislosti s globálním oteplováním a vzrůstající koncentrací CO₂ byla studována tvorba kokolitů u *Emiliana huxleyi* při různých koncentracích CO₂ a teplotách. *E. huxleyi* zabudovává CO₂ do vápenatých kokolitů na svém povrchu. Vzrůstající teplota snižuje množství rozpuštěného CO₂ a tím nepřímo ovlivňuje kalcifikaci. Autoři zjistili, že s vzrůstající teplotou se zmenšovala velikost kokosféry i kokolitů. Společně s rostoucí koncentrací CO₂ a teplotou se snižovala rychlost kalcifikace. V této věci ovšem autoři nepřímo naznačují vzrůstající koncentraci CO₂ není vzrůstající teplotou (De Bodt et al., 2010). Oproti tomu starší studie Watabe et al. (1996) ukázala, že samotná teplota výrazně ovlivňuje produkci kokolitů i jejich morfologii. Nejvíce kalcifikovaly buňky v rozmezí teplot 18-24°C. Rostoucí teplota ovlivnila také velikost kokolitů. Buňky při teplotě 18°C měly nejmenší podíl abnormálně tvarovaných kokolitů (20%). Porozumět vlivu teploty na morfologii kokolitů je důležité i z hlediska paleontologického, protože kokosféry jsou významnou součástí sedimentů (Watabe et al., 1996).

Druh *Micrasterias rotata* vnují v této věci pozornost, protože sloužil jako jeden z modelových druhů pro praktickou část mé bakalářské práce. Všechny informace (pokud není uvedeno jinak) pochází z práce Neustupa et al. (2008). Buňka *Micrasterias* se skládá ze dvou symetrických polobuněk. Každá polobuňka je dělena na jeden polární a dva laterální laloky, které se dále dělí na jemnější laloky (Prescott et al., 1977). Na každé buňce máme dvě osy symetrie. První osa, která prochází mezi polobunkami, dělí buňku na mateřskou a dceřinou. Druhá osa pak prochází kolmo na první osu a dělí buňku na pravou a levou část. V této morfologické variabilitě mezi polovinami je určena osou procházející mezi polobunkami. To proto, že dceřiná buňka může růst v odlišných podmínkách a buňka mateřská, například se ve fázi růstu ještě nachází a morfologická odlišnost je tak určena jinou velikostí buňky (Savriama et al., 2010).

Pokusy, během kterých byly v kultuře pěstovány buňky *Micrasterias rotata* při teplotách 10, 15, 20, 25 a 30°C po dobu dvou týdnů, ukázaly, k jakým tvarovým změnám s rostoucí teplotou dochází. Pro buňky z chladnějších teplot bylo charakteristické prodloužení apikálního laloku, hluboké zářezy mezi laloky a laloky a hluboký zářez v istmu. S rostoucí teplotou pak docházelo k změně tvaru zářezů a zkracování apikálního laloku (Obr. 14). Velikost buněk klesala od 15°C k 30°C, ovšem buňky z 10°C byly menší než buňky z 15°C. To

pravd podobn proto, že 10°C je již za hranicí platnosti *temperature-size rule*, kde dochází k zmen-ování bun k (Atkinson et al., 2003). Atkinson et al., 2003 ve své práci jako jeden z možných důvodů zmen-ování velikosti bun k uvádí vzr stání pom ru povrchu a objemu. Bu ky *Micrasterias rotata* společně se zv t-ováním velikosti zv t-ují svůj povrch, čímž tento pom r stabilizují. To jim umožní uje lépe využít okolní zdroje. Navíc pravd podobn rychleji rostoucí bu ky z vyšších teplot mají mén času na vytvo ení složitých morfologických struktur. Korelace tvaru a velikosti bun k ukázala stejný tvarový trend jako korelace s teplotou, tedy že bu ky men-í, které odpovídají organism m z teplejších podmínek, m ly m l í zá ezy oproti bu kám v t-ím. Při porovnání podobnosti p írodních a kultivovaných vzork bylo zji-eno, že p írodní populace jsou nejvíce podobné kulturám p stovaným p í teplotách 10 a 15°C, což odpovídá pr m rným m sí ním teplotám na lokalit . Nejv t-í roli v morfogenezi pravd podobn hrají no ní a brze ranní teploty, kdy dochází k d lení. Nejníší disparita byla zji-ena u bun k z 10°C. Mezi disparitou ostatních populací nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl. Mezi bu kami z 30°C populace bylo ov-ém nalezeno p íbližn 30% teratologických forem. To pravd podobn proto, že takto vysoké teploty jsou pro bu ky stresující a naru-ují tak jejich ontogenetický vývoj.



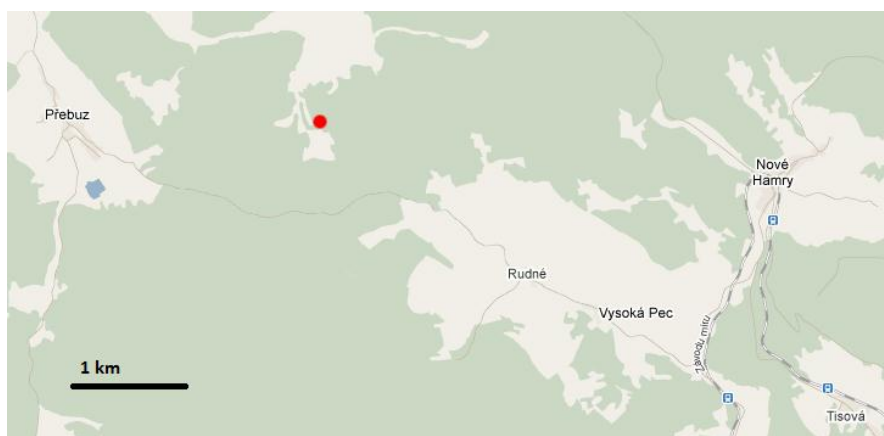
Obr. 14: Morfoligické zm ny vyvolané teplotou na *M. rotata*

3. Praktická část

Cílem praktické části bylo zjistit, jestli existuje sezonná podmínková variabilita buněk *Micrasterias* na teplotu prostředí pomocí analýzy tvaru. Rod *Micrasterias* jsem si vybrala nejen kvůli jeho velikosti a jednoznačné morfologii, ale také kvůli tomu, že slouží jako tradiční fosilní modelový druh (Prescott et al., 1997). U laboratorních kultur pěstovaných při různých teplotách bylo zjištěno, že existuje morfologická adaptace na teplotu, ve které buňky rostou. Ve své praktické části jsem se zaměřila na ověření této hypotézy v přírodních podmínkách, jelikož obecná data tohoto typu o protistních organizmech z přírody zatím bohužel chybí. Praktická část měla sloužit jako úvodní studie k mé budoucí diplomové práci a také k seznámení se se základními principy a metodami geometrické morfometrie.

3.1. Lokalita

Vzorky jsem odebírala na malém prameništím rašeliništi v Krušných horách východně od obce Přebuz (Obr. 15, 16). Na rašeliništi jsem si zvolila 4 oddělená místa (Tab. 1), která od sebe byla vzdálená přibližně 30 metrů a nebyla vzájemně propojená. Oddělená místa jsem přitom vybrala tak, aby se na nich vyskytoval jeden z druhů *Micrasterias thomasiana* nebo *Micrasterias rotata*.



Obr. 15: Prameniští rašeliniště u Přebuzi



Obr. 16: Fotografie odb rové lokality

Loaklita	Zem pisné sou adnice	Nalezený druh
1	50° 21' 50.5'' s. – 12° 39' 24.7'' v. d.	<i>Micrasterias thomasiana</i>
2	50° 21' 51.4'' s. – 12° 39' 24.1'' v. d.	<i>Micrasterias thomasiana</i>
3	50° 21' 50.2'' s. – 12° 39' 21.7'' v. d.	<i>Micrasterias thomasiana</i>
4	50° 21' 51.0'' s. – 12° 39' 20.5'' v. d.	<i>Micrasterias rotata</i>

Tab 1: Odb rová místa a nalezené druhy

3. 2. Metodika

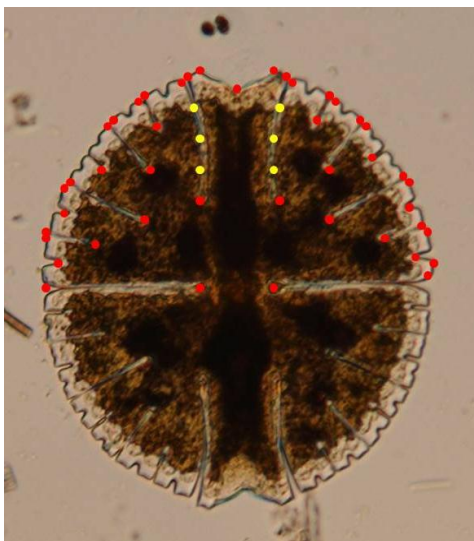
3. 2. 1. Odb r a zpracování vzork

Lokalitu jsem nav-tívil 3. 5. 2010 a 1. 10. 2010. Dv náv-t vy jsem uskute nila proto, fle m zajímalo, jak ovlivnily tvar bun k studené zimní a teplé letní podmínky. V t chto obdobích by ve v-ech populacích m ly p evládat bu ky, které tyto stresové podmínky p effily. Odb rová místa jsem ur ila podle GPS sou adnic a zna ky v terénu (klacík) ozna ující p esné místo, v jeho fl 10cm okolí jsem vzorky odebírala. Samotný odb r jsem provád la fldímáním ra-eliníku. Vzorky jsem ihned nafixovala Lugolovým roztokem a uchovávala je v lednici.

Bu ky jsem fotila pomocí světelného mikroskopu Olympus BX51 se 400násobným zvětšením a fotografickým aparátem Olympus Z5060. Náhodně jsem vybrala a vyfotila 30 buněk *Micrasterias*. Některé fotografie ovšem nebyly dostatečně kvalitní, proto jsem je ze souboru pro další analýzu vyřadila. Fotografie jsem upravila pomocí grafického programu Corel PaintShop Photo Pro X3.

3. 2. 2. Analýza dat

Fotografie buněk *Micrasterias* jsem zpracovávala pomocí metod geometrické morfomeriky za využití softwaru Tps - Tps Dig (Rohlf, 2010), Tps Util (Rohlf, 2010) a PAST (Hammer et al., 2001). Následující metodické postupy pochází z monografie Zelditch et al. (2004). Na každé vztřetí buňce jsem prostřednictvím programu Tps Dig vyznačila 43 homologních landmarků, z nichž 6 byly semilandmarky (Obr. 17). Landmarky byly umístěny rovnoměrně po obvodu ventrálních laloků a apikálního laloku, semilandmarky pak po stranách apikálního laloku, protože se zde nenachází žádné morfologicky jednoznačně definované struktury. Jejich zvolení je tedy velmi vhodné, protože při následném zpracování je s nimi možné pracovat jako s klouzavými body, jejichž pozice se optimalizuje automaticky. Jelikož landmarky na buňkách nejsou podle pravo-levé osy symetrické (například v důsledku nepřesností při jejich umístění anebo natočení buňky při fotografování), bylo nutné data symetrizovat (Savriama et al., 2008). Vytvořila jsem zrcadlovou kopii landmarkových souřadnic podle pravo-levé osy v programu PAST (nejprve jsem vynásobila x-ové souřadnice faktorem -1 a poté zrcadlově vyměnila pozice jednotlivých landmarků), kterou jsem zpracovávala s předními hodnotami. Tím landmarky získaly absolutně symetrickou pozici na obou stranách pravo-levé osy.



Obr. 17: Umístění landmark (červené) a semilandmrk (fluté)

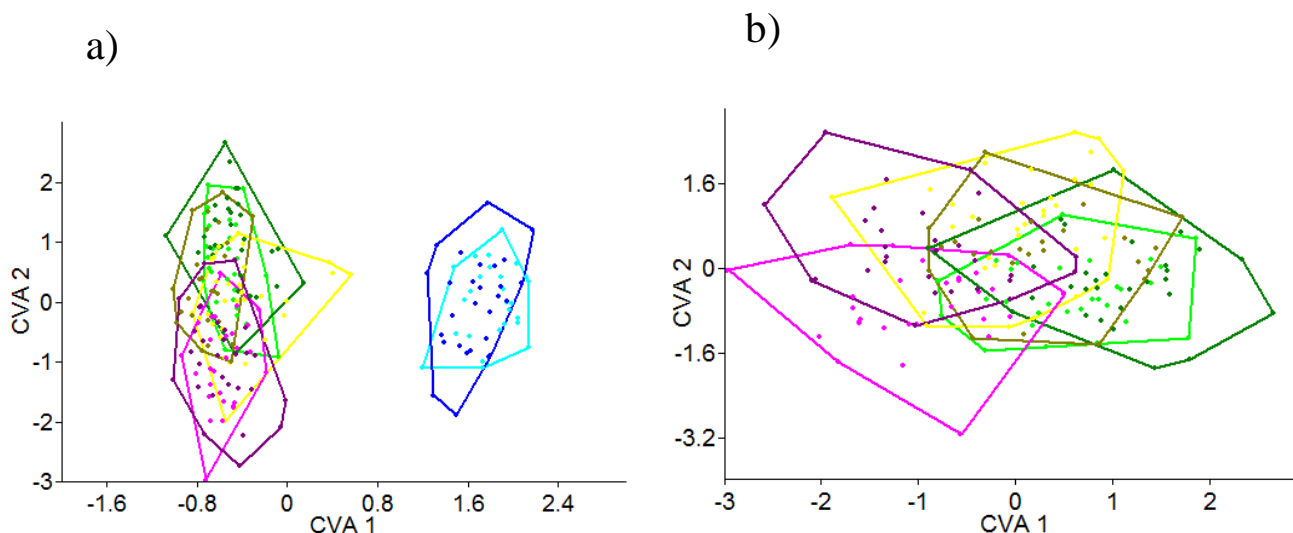
V programu Tps Util jsem jednotlivé landmrkové soubory sloučila dohromady a následně jsem v programu Tps Relw provedla Prokrustovskou analýzu (GPA), která standardizuje velikost buněk a optimalizuje jejich rotaci a translaci tak, aby vzdálenost homologních landmark byla co nejmenší.

Analýzu hlavních komponent (PCA) jsem prováděla v programu PAST. Na prvních 11 osách PCA jsem porovnávala tvarovou odlišnost odbových míst s *M. thomasina* a *M. rotata* pomocí MANOVA (CVA analýzy). MANOVA (multivariátní analýza variance) a CVA (analýza kanonických variát) hledá pro p edem rozlišené skupiny kritérium v podobě osy, která odliší jednu libovolnou skupinu od ostatních. Hranici signifikance jsem si stanovila na $p < 0,05$. Ve stejném programu jsem také udělala diskriminační analýzu květových a líjnových odbových míst z jednotlivých odbových míst a všech populací *M. thomasiana* dohromady. Diskriminační analýza měla za úkol zjistit, jestli existuje rozdíl v tvaru mezi květovými a líjnovými odbovými. Jako hranici signifikantního rozdílu jsem si stanovila $p < 0,01$.

3. 3. Výsledky

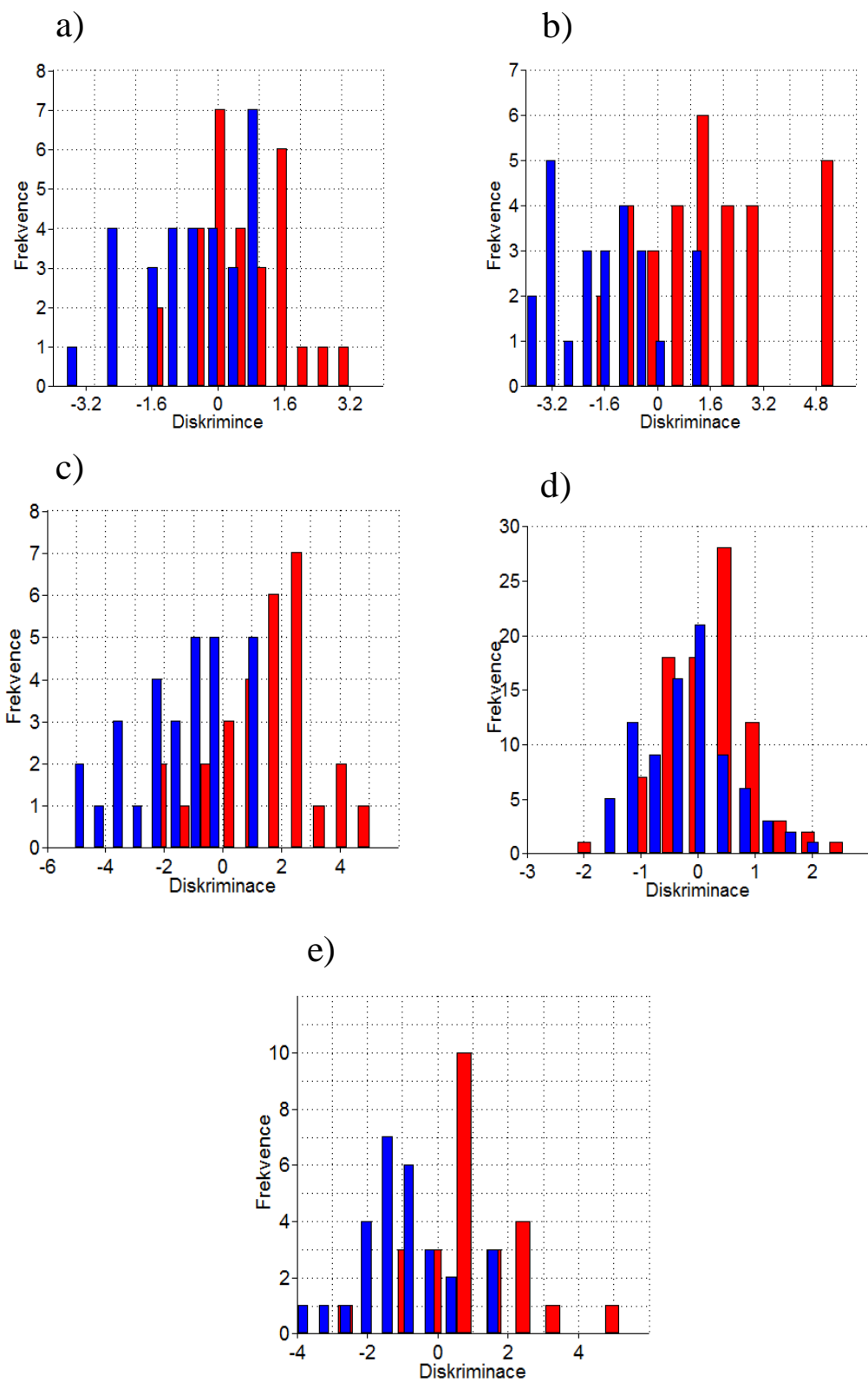
Pokusila jsme se zjistit, jestli existuje rozdíl v morfologii buněk na jednotlivých odbových místech. Nejprve jsem testovala podobnost květových i líjnových odbových míst s oběma druhy. K tomuto účelu jsem použila CVA analýzu (Obr. 18), která ukázala signifikantní rozdíl mezi

odb rovými místy s *M. thomasiانا* a *M. rotata* ($p < 0,0001$). Dále jsem testovala rozdíl odb rových míst s *M. thomasiانا* mezi sebou. Analýza op t ukázala signifikantní rozdíl ($p < 0,0001$). Od ostatních se nejvíce li-ily kv tnové bu ky z odb rového místa 3, ov-em i rozdíly mezi ostatními odb rovými místy byly navzájem veliké, proto tato odli-nost není významná. Absence rozdílu se ukázala pouze mezi kv tnovými a íjnovými bu kami na odb rovém míst 1.



Obr. 18: CVA kv tnových a íjnových odb rových míst (a) a odb rových míst s *M. thomasiانا* (b): V obrázku jsou 4 barvy (*M. thomasiانا*: odb rové místo 1 - zelená, 2 - flutá, 3 ó fialová, *M. rotata*: 4 ó modrá) a od každé barvy 2 odstíny. Sv tlý odstín zna í kv tnový odb r, tmavý podzimní.

Pomocí diskrimina ní analýzy jsem testovala, jestli se od sebe li-í bu ky z kv tnového a íjnového odb ru na jednotlivých místech a jestli se existuje celkový rozdíl mezi kv tnovými a íjnovými populacemi *M. thomasiانا*. Pro *M. thomasiانا* neukázala analýza signifikantní rozdíl pouze na odb rovém míst 1 kde $p_1 > 0,1$. Na odb rovém míst 2 a 3 od sebe dokázala signifikantn odd lit kv tnové a íjnové bu ky ($p_2 < 0,001$, $p_3 < 0,0015$). Celková analýza pro tento druh ov-em vy-la výrazn nesignifikantn ($p_{thomasiانا} > 0,017$). Odli-nost bun k druhu *M. rotata* na odb rovém míst 4 také nebyla signifikantn odli-ná ($p_4 > 0,029$) a rozdíl mezi tvarem kv tnových a íjnových bun k nebyl statisticky prokázán.



Obr. 19: Výsledky diskrimina ní analýzy: a-c: odb rov á místa 1-4 s *M. thomasiana*, d: celková analýza pro *M. thomasiana*, e: odb rov místo 4 s *M. rotata*)

3. 4. Diskuze

Analýza kanonických variát (CVA) morfologie buněk *M. thomasiana* a *M. rotata* dokázala od sebe oba druhy velmi dobře rozlišit. Z CVA diagramu je zřejmé, že oba odbovy *M. rotata* jsou odlišné od ostatních odbov s druhem *M. thomasiana*, což svědčí o dobré morfologické definici druhu.

3. 4. 1. *Micrasterias thomasiana*

Analýza kanonických variát (CVA) ukázala, že jednotlivá odbovová místa se od sebe ve tvaru buněk velmi liší. Nejpodobnější si ve srovnání s ostatními byly květované a říjnové buňky z odbovového místa 1.

To potvrdily i výsledky celkové diskriminační analýzy pro tento druh, které ukázaly, že pravděpodobně neexistuje rozdíl ve tvaru mezi květovými a říjnovými populacemi. Analýza pro odbovová místa 2 a 3 však vyšla signifikantně. Příčinou tohoto rozporu mohou být například odlišné lokální podmínky na jednotlivých odbovových místech nebo odlišný genotyp buněk (vzniklý například v důsledku genetického driftu), který způsobil tvarový rozdíl mezi květovými a říjnovými populacemi. Tato změna však může mít na jednotlivých odbovových místech odlišný charakter a nemusí tak tedy mít souvislost s reakcí na odlišnou teplotu.

3. 4. 2. *Micrasterias rotata*

Výsledky o tomto druhu jsou ovlivněné skutečností, že jsem jej našla pouze na jednom odbovovém místě a nemám tedy dostatek dat. Diskriminační analýza ukázala, že na odbovovém místě s tímto druhem nebyl rozdíl v morfologii květových a říjnových buněk a je tedy možné, že ani u tohoto druhu neexistuje morfologická reakce na teplotu prostředí.

4. Závěr

V teoretické části své práce jsem shrnula souhrnné poznatky o vlivu teploty na fenotypickou plasticitu protist. I když se reakce jednotlivých druhů mohou vzájemně lišit, existují dvě základní pravidla, která platí pro většinu protistních organizmů. Prvním z nich je nárůst metabolické (a tím pádem i růstové) rychlosti, druhým pak změna velikosti buněk s narůstající teplotou. Tato dvě pravidla zásadním způsobem ovlivňují všechny další fyziologické a ekologické zákonitosti, které s reakcí na teplotu souvisí. Literární informace o vlivu teploty na růstové parametry, velikost i morfologii protist v laboratorních podmínkách jsou velmi dobře dostupné. Data z přírodních podmínek je již výrazně méně a informace o vlivu teploty na disparitu téměř chybí.

V praktické části jsem provedla základní analýzu vlastních dat. Analyzovala jsem vlastní sbírky rodu *Micrasterias* a zabývala jsem se rozdíly v morfologii květových a říjnových populací, tedy těch, které přežily studené zimní a teplé letní podmínky. Dospěla jsem k závěru, že pro druh *M. thomasiana* ani *M. rotata* neexistuje sezónní podmíněná morfologická variabilita nebo je pouze hraničně detekovatelná. Tyto závěry ovšem mohou být zkrácené malým datovým souborem, zvláště pak u *M. rotata*, a proto vyžadují podrobnější prozkoumání.

5. Literatura:

Atkinson D., Ciotti B. J. & Montagnes D. J. S. (2003): Protist decrease in size linearly with temperature: ca 2.5% °C⁻¹. ó *Proceedings: Biological Sciences*, 270: 2605-2611.

Atkinson D. & Sibly R. M. (1997): Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. ó *Trends in Ecology and Evolution*, 12.

Brauer V. S., De Jonge V. N., Buma A. G. J. & Weissing J. (2009): Does universal temperature dependence apply to communities? An experimental test using natural plankton marine assemblages. ó *Oikos*, 118: 1102-1108.

De Bodt C., Van Oostende N., Harlay J., Sabbe K. & Chou L. (2010): Individual and interacting effects of pCO₂ and temperature on *Emiliana huxleyi* calcification: study of the calcite production, the coccolith morphology and the coccosphere size. ó *Biogeosciences*, 7: 1401-1412.

De Boer M. K., Koolmees E. M., Vrieling E. G., Breeman A. M. & Van Rijssel M. (2005): Temperature responses of three *Fibrocapsa japonica* (Raphidophyceae) from different climate regions. ó *Journal of Plankton Research*, 27: 47-60.

De Miranda M., Gaviano M. & Serra E. (2005): Changes in the cell size of the diatom *Cylindrotheca closterium* in a hyperhaline pond. ó *Chemistry and Ecology*, 21: 77-81.

Debat V., Bégin M., Legout H. & David J. R. (2003): Allometric and nonallometric components of Drosophila wing shape responded differently to developmental temperature. ó *Evolution*, 57: 2773-2784

Finkel Z. V., Beardall J. Flynn K. J., Quiqq A., Rees T. A. V. & Raven J. A. (2010): Phytoplankton in a changing world: cell size and elemental stoichiometry. ó *Journal of Plankton Research*, 32: 119-137.

Gächter E. & Weisse T. (2006): Local adaptation among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi*. I. Temperature response. ó *Aquatic Microbial Ecology*, 45: 291-300.

Hammer O., Harper D. A. T. & Ryan P.D. (2001): PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. ó *Paleontologia Electronica*, 4: 9

Lichtman E., Pinto P. T., Klausmeier Ch. A., Thomas M. K. & Yoshiyama K. (2010): Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. ó *Hydrobiologia*, 653: 15-28.

Li W. K. W., Harrison W. G. & Head E. J. H. (2006): Coherent assembly of phytoplankton communities in diverse temperate ocean ecosystems. - *Proceedings: Biological Sciences*, 273: 1953-1960.

- Montagnes D. J. S. & Franklin D. J.** (2001): Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. *ó Limnology and Oceanography*, 46: 2008-2018.
- Morabito G., Oggioni A., Caravati E. & Panzani P.** (2007): Seasonal morphological plasticity of phytoplankton in Lago Maggiore (N. Italy). *ó Hydrobiologia*, 578: 47-57.
- Morán X. A. M., López-Urrutia Á., Calvo-Díaz A. & Li W. W.** (2010): Increasing importance of small phytoplankton in a warmer ocean. *ó Global Change Biology*, 16: 1137-1144.
- Neustupa J., Štaný J. & Hoda L.** (2008): Temperature-related phenotypic plasticity in the green microalga *Micrasterias rotata*. *ó Aquatic Microbial Ecology*, 51: 77-86.
- Padisák J., Soróczki-Pintér E. & Reznér Z.** (2003): Sinking properties of some phytoplankton shapes and the relation of form resistance to morphological diversity of plankton: an experimental study. *ó Hydrobiologia*, 500: 243-257.
- Prescott G. W., Croasdale H. T. & Winyard W. C.** (1997): A synopsis of North American desmids: Part II. *Desmidiaceae ó Placodermae*, University of Nebraska Press, Lincoln.
- Raven A. J. & Geider R. J.** (1988): Temperature and algal growth. *ó New Phytologist*, 110: 441-461.
- Rohlf F. J.** (2010): Tps Dig, verze 2.16, (2010): Tps Utility program, verze 1.46
- Savriama Y., Neustupa J. & Klingenberg C. P.** (2010): Geometric morphometrics of symmetry and allometry in *Micrasterias rotata* (Zygnematophyceae, Viridiplantae). *ó Nova Hedwigia*, 136: 43-54.
- Snoeijs P., Busse S. & Potapova M.** (2002): The Importance of diatom cell size in community analysis. *ó Journal of Phycology*, 38: 265-272.
- Sohrin R., Imazawa M., Fukuda H. & Suzuki Y.** (2010): Full-depth profiles of prokaryotes, heterotrophic nanoflagellates, and ciliates along a transect from the equatorial to the subarctic central Pacific Ocean. *ó 57: 1537-1550.*
- Staehr P. A. & Birkeland M. J.** (2006): Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *ó Phycologia*, 45: 648-656.
- Stibal M. & Elster J.** (2005): Growth and morphology variation as a response to changing environmental factors in two Arctic species of *Raphidonema* (Trebouxiophyceae) from snow and soil. *ó Polar Biology*, 28: 558-567.
- Watabe N. & Wilbur K. M.** (1996): Effects of temperature on growth, calcification and coccolith form in *Coccolithus huxleyi* (Coccolithinae). *ó Limnology and Oceanography*, 11: 567-575.

Weisse T. & Rammer S. (2006): Pronounced ecophysiological clonal differences of two common freshwater ciliates, *Coleps spatei* (Prostomatida) and *Rimostrombidium lacustris* (Oligotrichida), challenge the morphospecies concept. *Journal of Plankton research*, 28: 55-63.

Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets D. H. & Fink W. L. (2004): Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, London.